



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B01J 19/00, B01L 3/00, C07K 1/04, C07H 21/00, C03C 17/30		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/03257
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Januar 1998 (29.01.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03571	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juli 1997 (07.07.97)	
(30) Prioritätsdaten: 196 28 928.9 18. Juli 1996 (18.07.96) DE	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-67056 Ludwigshafen (DE).	Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIPEL, Heinz (DE/DE); Im Eichenbühl 24, D-64625 Bensheim (DE). KELLER, Harald (DE/DE); Dammstueckerweg 29, D-67069 Ludwigshafen (DE).	
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).	

(54) Title: SOLID SUPPORTS FOR ANALYTICAL MEASURING PROCESSES, A PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND THEIR USE

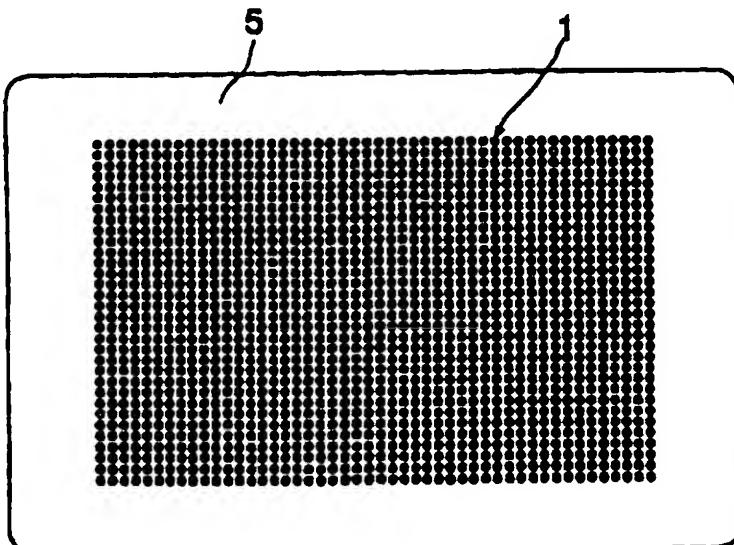
(54) Bezeichnung: FESTE TRÄGER FÜR ANALYTISCHE MESSVERFAHREN, EIN VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention concerns solid supports (5) for analytical measuring processes, said supports being substantially composed of an inert solid carrier material on which hydrophilic measurement regions (2) are separated from one another by a hydrophobic coating (1), at least ten measuring points per cm² being applied to the support. The invention further concerns a process for preparing these supports, and their use in the fields of diagnosis, active substance screening, combinatorial chemistry, plant protection, toxicology and environmental protection.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft feste Träger (5) für analytische Messverfahren, die im wesentlichen aufgebaut sind aus einem inerten festen Trägermaterial, auf dem hydrophile Messbereiche (2) durch eine hydrophobe Beschichtung (1) voneinander getrennt sind, wobei mindestens 10 Messpunkte pro cm² auf dem Träger aufgebracht sind. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Träger, sowie die Verwendung der Träger in der Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie oder im Umweltschutzbereich.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Feste Träger für analytische Meßverfahren, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft feste Träger für analytische Meßverfahren, die im wesentlichen aufgebaut sind aus einem inerten festen Trägermaterial, auf dem hydrophile Meßbereiche, die gegebenenfalls mit einer Oberflächenladung versehen sind, durch mindestens eine hydrophobe Beschichtung voneinander getrennt sind, wobei auf dem Träger größer oder gleich 10 Meßpunkte pro cm² aufgebracht sind. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Träger, sowie die Verwendung der Träger in der Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie oder im Umweltschutzbereich.

Eine Hauptaufgabe der Wirkstoffsuchforschung im Pflanzenschutz oder in der Medizin ist die Identifizierung neuer Leitstrukturen und die Entwicklung von Wirkstoffen, die aus diesen Strukturen hervorgehen.

In der klassischen Wirkstoffsuchforschung wurde die biologische Wirkung neuer Verbindungen in einem Zufalls-Screening am ganzen Organismus beispielsweise der Pflanze oder dem Mikroorganismus getestet. Dabei wurden komplexe In-vitro- und In-vivo-Testmethoden eingesetzt, mit denen pro Jahr nur einige hundert Substanzen getestet werden konnten.

Die biologische Testung war dabei gegenüber der Synthesechemie der limitierende Faktor.

Durch die Bereitstellung molekularer Testsysteme, die in der Molekular- und Zellbiologie entwickelt wurden, hat sich die Situation drastisch verändert. Diese molekularen Testsysteme wie beispielsweise Rezeptorbindungsassays, Enzymassays oder Zell-Zellinteraktionsassays lassen sich in der Regel gut in Mikrotiterplatten in Reaktionsvolumen zwischen 50 bis 250 µl durchführen und einfach automatisieren. Die Automatisierung und Miniaturisierung dieser Testsysteme ermöglicht einen hohen Proben-durchsatz. Durch diese Entwicklung lassen sich große Zahlen verschiedener Chemikalien auf eine mögliche Verwendung als Leitstruktur in der Wirkstoffsuchforschung testen.

Ein modernes automatisiertes Testsystem ermöglicht in einem Massenscreening die Prüfung von 100.000 und mehr Chemikalien pro Jahr auf ihre biologische Wirkung. Mikrotiterplattenassays werden sehr häufig verwendet, da sie in der Regel geringe Kosten verursachen, sehr sicher und wenig störanfällig sind.

Um die Leistungsfähigkeit dieser Testsysteme voll ausschöpfen zu können, wurden und werden immer neue Festphasensynthesen in der kombinatorischen Chemie entwickelt.

10

Die kombinatorische Chemie ermöglicht die Synthese einer breiten Vielfalt unterschiedlicher chemischer Verbindungen, sogenannter Substanzbibliotheken. Dies gilt insbesondere, wenn sich die kombinatorische Chemie der automatisierten Festphasensynthese bedient (s. z.B. Übersichtsartikel I. Med. Chem. 1994, 37, 1233 und 1994, 37, 1385). Die Synthese an der Festphase hat den Vorteil, daß eine große Vielzahl an Verbindungen synthetisiert werden können und daß Nebenprodukte und überschüssige Reaktanten leicht entfernt werden können, so daß eine aufwendige Reinigung der Produkte nicht notwendig ist.

Durch die Vielzahl der synthetisierten Verbindungen in der kombinatorischen Chemie kann die Leistungsfähigkeit moderner automatisierter Testsysteme von Seite der Chemikalienvielfalt voll ausgenutzt werden. Da aber im Gegensatz zur klassischen Wirkstoffsynthese die zu untersuchenden Chemikalien bei der Synthese mittels kombinatorischer Chemie nicht in beliebiger Menge zur Verfügung stehen, kann aufgrund der erforderlichen Chemikalienmengen in den Testsystemen nur eine eingeschränkte Zahl von Testsystemen geprüft werden.

Ein weiterer Nachteil der vorhandenen Testsysteme beispielsweise in der Wirkstoffsuchforschung, in der Diagnostik, im Umweltschutz oder Pflanzenschutz ist, daß für viele Testsysteme die benötigten Reagentien wie beispielsweise Enzyme, Antikörper, Rezeptoren, Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktiv oder sonstig markierte Liganden, Cytokine, Aktivatoren, Inhibitoren oder sonstige Reagentien teuer, schwer herstellbar sind und/oder nicht in ausreichender Menge für die automatisierten Tests zur Verfügung stehen.

40

In DE-A 44 35 727 wird ein Ansatz zur Reduktion der für einen Test benötigten Reagentien beschrieben.

Nachteil dieses Verfahrens ist, daß der Träger für die Messungen erst aufwendig in einem mehrstufigen Verfahren hergestellt werden muß.

Ein weiterer Nachteil ist, daß die Reaktionen, die mit diesem Trägermaterial durchgeführt werden können, auf festphasengebundene Reaktionen wie die Reaktantenbindung zwischen Antikörpern, Antigenen, Haptenen oder Nucleinsäuren beschränkt sind. Reaktionen in Lösung können mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

Es bestand daher die Aufgabe, ein neues analytisches Meßverfahren, das ohne die genannten Nachteile durchführbar ist, zu entwickeln und für die Wirkstoffsuchforschung, die Diagnostik, den Umweltschutz, den Pflanzenschutz, der Toxikologie oder für die kombinatorische Chemie zur Verfügung zu stellen.

Die gestellte Aufgabe konnte dadurch gelöst werden, daß man den eingangs beschriebenen festen Träger für das Meßverfahren verwendet.

Es wurde gefunden, daß die Oberflächenspannung, die einer weiteren Miniaturisierung der vorhandenen Mikrotiterplattentechnik zu immer kleineren Reaktionslöchern (= Wells) hin im Wege steht, da durch sie in sehr kleinen Mikrotiterplattenvertiefungen Kräfte wie die Adhäsion der Reaktionsflüssigkeit an die Oberfläche der Mikrotiterplatten oder die Kapillarkräfte eine immer größere Rolle spielen und so eine Befüllung der Reaktionslöcher und damit eine Messung unmöglich machen, für die erfindungsgemäßen Träger vorteilhaft genutzt werden kann.

Unter hydrophilen Meßbereichen des Trägers sind Gebiete des Trägers zu verstehen, auf denen bzw. in denen nach Aufbringung der Reaktionsflüssigkeit und damit der Reaktanten die Messung durchgeführt wird (siehe Nummer 2 in den Figuren 1, 3 und 4). Sie entsprechen damit den "Wells" bzw. den Vertiefungen der Mikrotiterplatten und werden nachstehend als "Meßbereiche oder Meßpunkte" bezeichnet.

35

Die hydrophilen Meßbereiche des Trägers sind vorteilhaft von einem hydrophoben Bereich (siehe Nummer 1 in den Figuren 1 bis 4) umgeben. Dieser hydrophobe Bereich kann aus mindestens einer hydrophoben Beschichtung aufgebaut sein, die den Träger vollständig oder nur teilweise mit Unterbrechungen bedeckt. Diese Unterbrechungen (siehe Nummer 5 in den Figuren 1 bis 4) sind vorteilhaftweise hydrophil.

Die Figuren 1 bis 4 dienen der beispielhaften Verdeutlichung der erfindungsgemäßen Träger.

Die Meßbereiche sowie die sie voneinander trennenden hydrophoben Bereiche (siehe Nummer 1 in den Figuren 1 bis 4) können beispielsweise durch Mikrolithographie-, Photoätz-, Mikrodruck- oder Mikrostempeltechnik aufgebracht werden oder mit Hilfe einer Maskentechnik aufgesprührt werden. Aus der Herstellungstechnik von Druckplatten sind photochemische Verfahren bekannt, mit denen Oberflächen von Platten oder Walzen gezielt an bestimmten Stellen hydrophob und an anderen Stellen hydrophil gemacht werden können. Mit dieser Technik lassen sich beispielsweise auf einfache Weise auf einem Träger, z.B. auf einer Glas- oder Metallplatte, ein Raster von mehreren Tausend regelmäßig angeordneten hydrophilen Meßbereichen (siehe Nummer 2 in den Figuren 1, 3 und 4), umgeben von hydrophoben Begrenzungen (siehe Nummer 1 in den Figuren 1 bis 4), herstellen. Dabei können zunächst ein oder mehrere hydrophobe Beschichtungen auf den Träger aufgezogen werden und anschließend die Meßbereiche an den gewünschten Stellen aufgebracht werden oder umgedreht zunächst die hydrophilen Meßbereiche und dann die hydrophoben Bereiche oder beides gleichzeitig aufgezogen werden. Es können auch mehrfach hydrophile Meßbereiche an die gleiche Stelle aufgetragen werden.

Figur 2 gibt beispielhaft einen erfindungsgemäßen Träger in Größe einer Mikrotiterplatte wieder.

Die Meßbereiche können eine beliebige Form haben, bevorzugt sind runde Meßbereiche.

Die hydrophobe Beschichtung oder Beschichtungen können zusammenhängend auf den Träger aufgebracht sein oder aber mit beliebig gestalteten Unterbrechungen versehen sein. Sie können auch als separate Bereiche um die Meßbereiche liegen, bevorzugt sind hydrophobe Ringe, die die hydrophilen Meßbereiche voneinander trennen.

Die hydrophobe Beschichtung bzw. Beschichtungen sollen das Verlaufen der Meßbereiche ineinander verhindern und so eine exakte Messung einzelner Reaktionsansätze ermöglichen.

Prinzipiell ist es möglich, jede beliebige Anzahl von Meßpunkten auf einen Träger aufzubringen, bevorzugt sind größer oder gleich 10 Meßpunkte pro cm^2 , besonders bevorzugt sind größer oder gleich 15 Meßpunkte pro cm^2 , ganz besonders bevorzugt sind größer oder gleich 20 Meßpunkte pro cm^2 . Dabei werden Reaktionsvolumina von wenigen nl bis zu einigen μl aufgetragen, bevorzugt werden Volumina kleiner 5 μl , besonders bevorzugt kleiner oder gleich 1 μl , aufgetragen.

Die Meßpunkte können in beliebigen Rastern auf den Träger aufgebracht werden, bevorzugt sind quadratische oder rechteckige Raster.

5 Der inerte feste Träger kann aus einer ebenen, planaren Platte eines eben solchen Blockes oder einer Folie beliebiger Form und Größe bestehen, die gegebenenfalls kleine Mulden (siehe Figur 4) an den Stellen der Meßbereiche haben kann, bevorzugt sind plane Träger (siehe Figur 3). Bevorzugt sind rechteckige oder quadratische Träger, besonders bevorzugt sind rechteckige Träger in Größe einer Standardmikrotiterplatte (127,5 mm x 85,5 mm) oder ganz-zahlige Vielfache der Mikrotiterplatten, die größer oder kleiner sein können wie beispielsweise die sogenannten Terasaki-Platten (81 mm x 56 mm, 60 Meßpunkte). Die bevorzugte Größe der 10 erfindungsgemäßen Träger hat den Vorteil, daß die gesamte Peripherie der automatisierten Mikrotiterplattentechnik ohne Umbau 15 verwendet werden kann.

Der Träger kann beispielsweise aus Materialien bestehen wie Glas, 20 Keramik, Quarz, Metall, Stein, Holz, Kunststoff, Gummi, Silicium, Germanium oder Porzellan. Die Materialien können in reiner Form, als Mischungen, Legierungen oder Blends oder in verschiedenen Schichten oder nach Beschichtung beispielsweise mit einem Kunststoff oder einem Lack zur Herstellung der erfindungsgemäßen Träger verwendet werden. Bevorzugt werden transparente Träger aus 25 Quarz, Glas, Kunststoff, Germanium oder Silicium hergestellt, die für alle visuellen Tests wie mikroskopische, kameraunterstützte, laserunterstützte Tests geeignet sind.

30 Als transparente Kunststoffe sind alle amorphen Kunststoffmaterialien, die einphasig oder mehrphasig mit gleichen Brechungsindex wie Polymere aus Acrylnitril-Butadienstyrol oder mehrphasig mit unterschiedlichem Brechungsindex, bei denen die Domänen der Kunststoffkomponenten Bereiche bilden, die kleiner 35 als die Wellenlänge des Lichts sind wie beispielsweise die Blockcopolymere aus Polystyrol und Butadien (sog. Polystyrol/Butadien-blends) geeignet.

Als besonders geeignete transparente Kunststoffe seien hier 40 Polystyrol, Styrolacrylnitril, Polypropylen, Polycarbonat, PVC (= Polyvinylchlorid), Polymethylmethacrylat, Polyester, Silicone, Polyethylenacrylat, Polylactid oder Celluloseacetat, Cellulosepropionat, Cellulosebutyrat oder deren Mischungen genannt. Silicium- oder Germaniumträger eignen sich besonders für Anwendungen, bei denen eine Detektion oder Induktion der Reaktion über 45 nahes Infrarotlicht erforderlich ist.

Der erfindungsgemäße Träger kann auch in Form eines Transportbandes ausgeführt sein, das bei Automatisierung der Assays an den Beschickungs-, Inkubations- oder Detektionsstationen vorbeilaufen kann.

5

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Träger geht beispielsweise von Keramik-, Quarz- oder Glasplatten aus. Der Träger wird dazu zweckmäßigerweise zunächst mit einem Reinigungsmittel beispielsweise einem Alkohol, einem alkalischen Reiniger 10 oder einem sauren Reiniger wie Reacalc® (enthält laut Angabe der Firma Chemotec GmbH, Phosphorsäure und Tenside) gesäubert. Zur Verbesserung der Reinigung kann diese vorteilhafterweise in einem Ultraschallbad vorgenommen werden. Nach der Reinigung wird der Träger direkt oder nach Spülung mit Wasser und/oder Alkohol oder 15 mit einem Alkohol/Wassergemisch getrocknet. Die hydrophobe Beschichtung des Trägers erfolgt beispielsweise mit einer 1%igen Hexadecyl-trimethoxy-silanlösung in einem Lösungsmittel wie Isopropanol/H₂O (9:1) mit Hilfe einer Stempeltechnik. Der Stempel wird kurz auf den Glasobjektträger zum Aufbringen der 1%igen 20 Hexadecyl-trimethoxy-silanlösung gedrückt. Anschließend wird der Träger getrocknet. Vorteilhafterweise wird der Glasträger bei erhöhten Temperaturen, das heißt bei Temperaturen größer 80 °C, getrocknet. Vorzugsweise wird der Träger nach Trocknung nochmals 25 zur Entfernung von überschüssigem Hexadecyl-trimethoxy-silan gespült beispielsweise mit einer Alkohol/Wassermischung wie Isopropanol/H₂O (9:1) .

Gegebenenfalls wird mit dieser Stempeltechnik eine zusätzliche Oberflächenladung im Bereich der hydrophilen Meßpunkte aufge- 30 bracht. Diese Oberflächenladung kann beispielsweise durch das Aufbringen von Proteinen, sauren oder basischen Polymeren wie Polylysin oder sauren oder basischen Molekülen erzeugt werden.

Zum Aufbringen von Probenmaterial und Reagenzien eignen sich alle 35 Methoden, die Flüssigkeitsmengen zwischen wenigen nl und wenigen µl dosieren können, wie beispielsweise Techniken, die in Tintenstrahldruckern, sogenannte Ink-Jet-Technologie (siehe DE-A 40 24 544) oder in der Durchfluß-Zytometrie, in sogenannten Zellsortern (Horan, P.K., Wheless, L.L., Quantitative Single 40 Analysis and Sorting, Science 1977, 198, 149 - 157) verwendet werden. Die Tropfenbildung kann dabei mit piezoelektrischer Zertropfung (Ultraschall), piezoelektrischer Tropfenausschleuderung oder Ausschleuderung durch Verdampfung (Ink-Jet-Technik) erfolgen. Es können Systeme mit permanenter Tropfenerzeugung oder 45 Systeme, die Tropfen auf Anforderung erzeugen, verwendet werden.

Mit diesen Techniken können einzelne Tröpfchen exakt dosiert und gezielt auf die einzelnen hydrophilen Meßpunkte der Multi-Analysen-Oberfläche des Trägers plaziert werden, indem zum Beispiel der Träger unter einer oder mehreren parallel angeordneten Düsen 5 entsprechend dem Takt der dosierten Flüssigkeit und entsprechend dem vorgegebenen Raster bewegt wird. Ebenso kann auch die Dosiervorrichtung beispielsweise aus mindestens einer Düse über dem Träger entsprechend dem Takt der dosierten Flüssigkeit und entsprechend dem vorgegebenen Raster bewegt werden.

10

Es können mit diesen Techniken, falls erforderlich, verschiedene Reagentien und/oder einzelne Zellen an die vorgegebenen Orte (= Meßpunkte) auf der Trägeroberfläche plaziert und zur Reaktion gebracht werden. Von Vorteil ist, daß bei den erfindungsgemäß 15 bevorzugten kleinen Volumina im Bereich von einigen Nanoliter bis zu wenigen Mikroliter eine Vermischung der Reaktanten durch Diffusion sehr rasch eintritt, so daß eine besondere mechanische Mischvorrichtung nicht notwendig ist. Es können auch vor der Zugabe von Flüssigkeitströpfchen zur Durchführung der eigentlichen Analyse gewisse Liganden, z. B. Proteine oder Nucleinsäuren, 20 auf dem Träger in adsorbiert oder chemisch gebundener Form vor der Zudosierung der Meßproben und der Reagentien bereits vorliegen.

25 Weitere Vorteile der erfindungsgemäßen Träger sind die Einsparung an Substanzen wie beispielsweise an zu testenden Chemikalien, an Enzymen, an Zellen oder sonstigen Reaktanten, an Zeit durch eine weitere Steigerung gegebenenfalls automatisierter paralleler Reaktionsansätze, an Platz- und Personalbedarf, durch eine 30 weitere Miniaturisierung der Reaktionsansätze und dadurch letztlich auch an Geld.

Die auf den Trägern abgelegten Tröpfchen können auch in Form von Geltröpfchen auf den Träger aufgebracht werden, die sich gegebenenfalls anschließend verfestigen und so die Verdunstung der 35 Reaktionsflüssigkeit verringern.

Die Verdunstung der Reaktionsflüssigkeit (siehe Nummer 3 in den Figuren 3 und 4) kann auch durch Überschichtung mit einer 40 hydrophoben Flüssigkeit (siehe Nummer 4 in den Figuren 3 und 4), wobei die hydrophobe Beschichtung oder Beschichtungen wie ein Anker wirken, verringert werden (Figur 3 und 4). Bevorzugt zur Überschichtung werden niedrigviskose Öle wie Silikonöle verwendet.

Die Verdunstung kann auch durch Inkubation der Träger in einer nahezu wasserdampfgesättigten Atmosphäre reduziert werden.

Durch Kühlung der Träger kann die Verdunstung ebenfalls reduziert werden.

Es können einzelne der genannten Elemente zur Verminderung der Verdunstung verwendet werden oder deren Kombinationen.

10 Die erfindungsgemäßen Träger eignen sich prinzipiell für alle heute in Mikrotiterplatten durchgeföhrten Analysenmethoden, wie beispielsweise kolorimetrische, fluorimetrische oder densitometrische Methoden. Dabei können die Lichtstreuung, Trübung, wellenlängenabhängige Lichtabsorption, Fluoreszenz, Lumineszenz, 15 Raman-Streuung, ATR (= Attenuated Total Reflection), Radioaktivität, Isotopenmarkierung, pH-Veränderungen oder Ionenverschiebungen vorteilhaft alleine oder in Kombination genutzt und gemessen werden, um hier nur einige der möglichen Meßgrößen zu nennen.

20 Als mögliche auf den erfindungsgemäßen Trägern durchführbare Analysenmethoden seien hier die Bindung von Antikörpern an Antigene, die Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden, die spezifische Spaltung von Substratmolekülen durch Enzyme, die Polymerase-Kettenreaktion ("PCR"), Agglutinationstests oder die 25 Wechselwirkung zwischen verschiedenen oder gleichen Zelltypen wie Enzymassays, Titrationsassays wie Virustitrationsassays, Erythrozyten- oder Plättchenaggregationsassays, Agglutinationsassays mit Latexkügelchen, ELISA- (= Enzyme-linked immunosorbent assay) oder RIA- (= Radioimmunoassay) genannt.

30 Die erfindungsgemäßen Träger können beispielsweise in der Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinatorischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie, im Umweltschutz beispielsweise bei cytotoxikologischen Tests, in der Medizin oder 35 der Biochemie eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Träger sind besonders für das Massen-screening geeignet.

40 Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen Träger für alle modernen bilderfassenden und bildauswertenden Analysensysteme.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Veranschaulichung der Erfindung, ohne sie in irgendeiner Weise einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung eines erfindungsgemäßen Trägers aus einem Glasobjektträger

5

zunächst wurde der Glasobjektträger mit einer 20%igen wässrigen Lösung eines sauren Reinigers (Reacalc®, Firma Chemotec GmbH) in einem Ultraschalltauchbad 10 Minuten gereinigt. Anschließend wurde der Glasobjektträger mit Wasser und danach mit absolutem

10 Ethanol gespült und bei ca. 23 °C getrocknet.

Mit einem Mikrostempel wurde auf dem hydrophilen Träger die hydrophobe Beschichtung in Form von hydrophoben Ringen (siehe Figur 1 bis 4) aufgebracht. Zur Aufbringung der hydrophoben 15 Schicht wurde eine 1%ige Hexadecyl-trimethoxy-silanlösung in Isopropanol/H₂O (9:1) verwendet. Der in die Silanlösung getauchte Stempel wurde kurz - ca. 5 sec. - auf den Träger gedrückt und anschließend wurde der Träger 15 Minuten bei 100 °C getrocknet. Überschüssige Silanlösung wurde durch Eintauchen des Trägers für 20 ca. 1 Minute in Isopropanol/H₂O (9:1) vom Träger entfernt. Es wurden zwei Typen von Stempeln zum Aufbringen von 12 bzw. 25 Meßpunkten pro Quadratzentimeter verwendet.

Beispiel 2

25

Protease-Inhibitor-Assay mit den erfindungsgemäßen Trägern

Mit einem nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren hergestellten Träger wurde ein Protease-Inhibitor-Assay durchgeführt.

30

In einer Kammer mit größer 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurden mit einem Mikro-Dosiersystem von der Firma Microdrop, Norderstedt, auf einem wie oben beschrieben hergestellten Objektträger 96 Proben mit jeweils 100 nl einer Lösung von Fluorescein-35 isothiocyanat-markiertem Casein (20 µg/ml) in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) aufgebracht. Die Anordnung der Reaktionströpfchen erfolgte entsprechend der durch den Stempel aufgebrachten, hydrophoben Bereiche (= Sperrsichten) in 8 Reihen und 12 Spalten in einem Raster von 2 x 2 mm. Die Breite der hydrophoben 40 Ringe war jeweils 0,4 mm.

Anschließend wurde je 1 nl verschiedener Protease-Inhibitoren in einer 1 mM Konzentration in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) mit dem Microdrop-Gerät zu den Reaktionsproben zugegeben. Die Zugabe 45 erfolgte exakt in die vorher aufgebrachte fluoreszenzmarkierte

Caseinlösung. Als Kontrolle wurde ein Nanoliter 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) verwendet.

Zum Schluß wurden 10 nl der Protease Trypsin in einer Konzentration von 10 mg/ml in Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) zur Reaktion gegeben.

Die Reaktionströpfchen wurden anschließend zur Reduktion der Verdunstung entweder mit Mineralöl, Silikonöl oder mit Paraffin-Öl, das mit dem Microdrop-Dosiersystem aufgebracht wurde, abgedeckt.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde der Assay gemessen. Hierzu wurde von der Objektträgerunterseite mit Hilfe eines Invert-Fluoreszenzmikroskops mit linear polarisiertem Licht im Bereich von 450 bis 485 nm Fluoreszenz angeregt und im Bereich von 515 bis 530 nm detektiert. Zur Detektion diente eine kühlbare CCD-Kamera mit vorgeschaltetem motorisch drehbarem Polarisationsfilter.

20

Es wurde die Anisotropie der Polarisation der Caseinmoleküle nach folgenden Gleichungen bestimmt:

25

$$A = \frac{I_{\text{senkrecht}} - I_{\text{parallel}}}{I_{\text{senkrecht}} + 2 \times I_{\text{parallel}}} \quad (\text{I})$$

$$P = \frac{I_{\text{senkrecht}} - I_{\text{parallel}}}{I_{\text{senkrecht}} + I_{\text{parallel}}} \quad (\text{II})$$

30

hierbei bedeutet:

- A die Anisotropie
- P die Polarisation
- 35 I_{parallel} die gemessene Intensität des Fluoreszenz-Lichtes bei einer Polarisation parallel zur Polarisation des Anregungslichtes und
- $I_{\text{senkrecht}}$ die gemessene Intensität des Fluoreszenz-Lichtes bei gekreuzten Polarisationsfiltern

40

Die Anisotropie ist ein Maß für die rotatorische Diffusionskonstante von Molekülen und kann als Maß zur Abschätzung der hydrodynamischen Molekülgrößen eingesetzt werden (G. Weber, Biochemie, Vol. 51, 1952, 145 - 155).

45

11

Wurde das Fluorescein-isothiocyanat-markierte Protein von der Protease gespalten, so wurde eine Polarisation im Bereich von 50 bis 75×10^{-3} gemessen. Wurde die Protease Trypsin inhibiert, so wurde eine Polarisation größer 150×10^{-3} gemessen.

5

Zur parallelen Auswertung aller 96 Reaktionsansätze wurde mit einem Objektiv aus einer Stereo-Lupe das gesamte Meßfeld mit den 96 Meßpunkten gleichzeitig erfaßt und mit einem Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet.

10

Beispiel 3

Protease-Inhibitor-Assay mit 1536 parallelen Meßpunkten

15 Es wurde ein Trypsin-Inhibitorassay wie unter Beispiel 2 beschrieben mit 1536 parallelen Meßpunkten auf der Größe einer Mikrotiterplatte (siehe Figur 2) durchgeführt.

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Fester Träger für analytische Meßverfahren, der im wesentlichen aufgebaut ist aus einem inerten festen Trägermaterial, auf dem hydrophile Meßbereiche, die gegebenenfalls mit einer Oberflächenladung versehen sind, durch mindestens eine hydrophobe Beschichtung voneinander getrennt sind, wobei auf dem Träger größer oder gleich 10 Meßpunkte pro cm² aufgebracht sind.
2. Fester Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Meßbereiche durch mindestens eine durchgehende hydrophobe Beschichtung voneinander getrennt sind.
3. Fester Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die auf dem Träger aufgebrachten hydrophilen Meßbereiche durch unterbrochene hydrophobe Bereiche voneinander getrennt sind.
4. Träger nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Trägermaterial Glas, Keramik, Quarz, Metall, Stein, Kunststoff, Gummi, Silicium oder Porzellan verwendet.
5. Träger nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein transparentes Trägermaterial ausgewählt aus der Gruppe Glas, Quarz, Silicium oder Kunststoff verwendet.
6. Verfahren zur Herstellung eines Trägers gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man den Träger mit mindestens einer hydrophoben Beschichtung versieht und die hydrophilen Meßbereiche mittels Mikrolithographie-, Photoätz-, Mikrodruck- oder Mikrostempeltechnik aufbringt.
7. Verfahren zur Herstellung eines Trägers gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man einen hydrophilen oder hydrophilisierten Träger mittels Mikrolithographie-, Photoätz-, Mikrodruck- oder Mikrostempeltechnik in der Weise mit mindestens einer hydrophoben Beschichtung versieht, daß voneinander getrennte hydrophile Meßbereiche entstehen.
8. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man in den hydrophilen Meßbereichen des Trägers zusätzlich eine Oberflächenladung aufbringt.

9. Analytisches Meßverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß man auf einem Träger gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 flüssige Analytenproben, die gegebenenfalls mit einer hydrophoben Schicht abgedeckt werden können, in den hydrophilen Meßbereichen auf-
5 bringt und analysiert.

10. Analytisches Meßverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man die analytische Messung in nahezu wasser-
dampfgesättigter Atmosphäre durchführt.

10 11. Analytisches Meßverfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch
gekennzeichnet, daß man die analytische Messung unter Kühlung
des Trägers durchführt.

15 12. Verwendung eines Trägers gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 in der
Diagnostik, in der Wirkstoffsuchforschung, in der kombinato-
rischen Chemie, im Pflanzenschutz, in der Toxikologie oder im
Umweltschutzbereich.

20

25

30

35

40

45

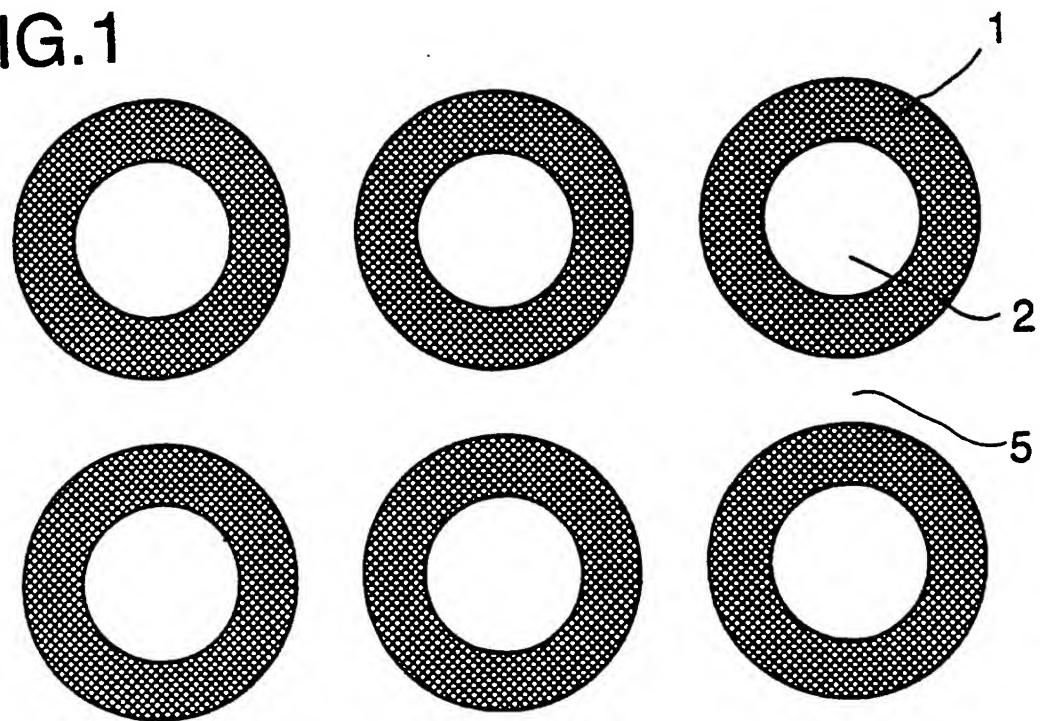
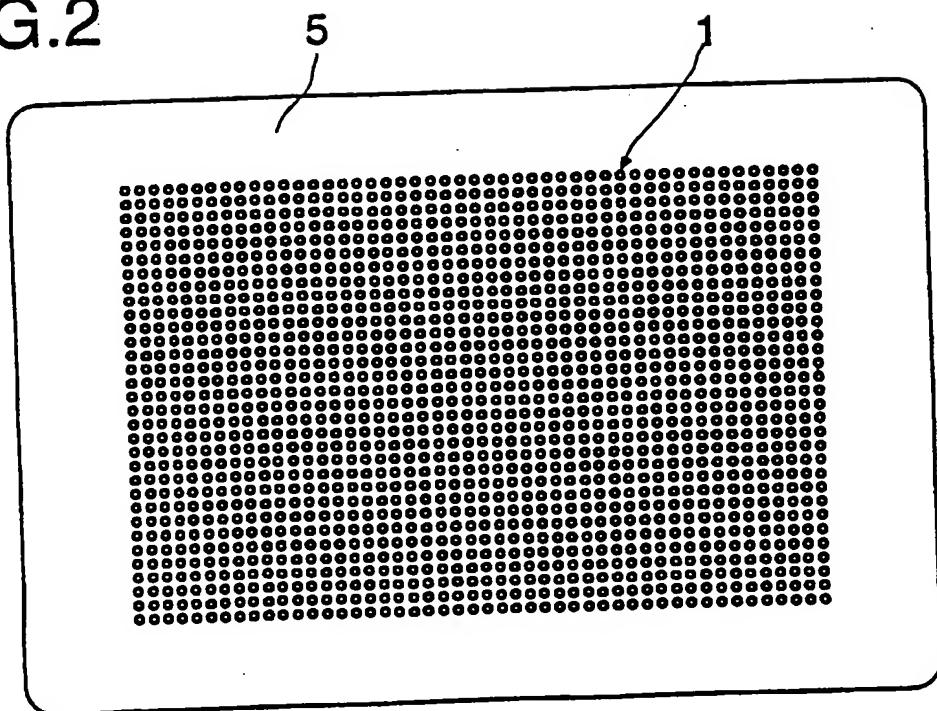
FIG.1**FIG.2**

FIG.3

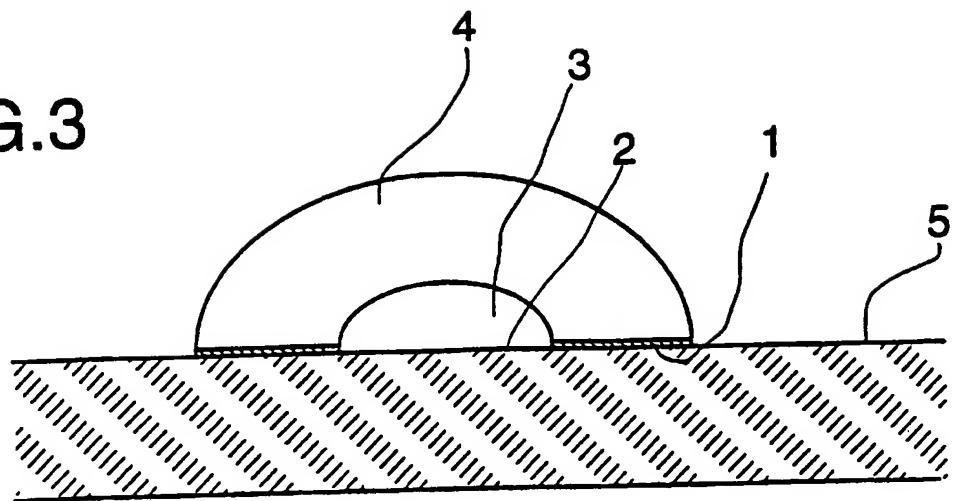
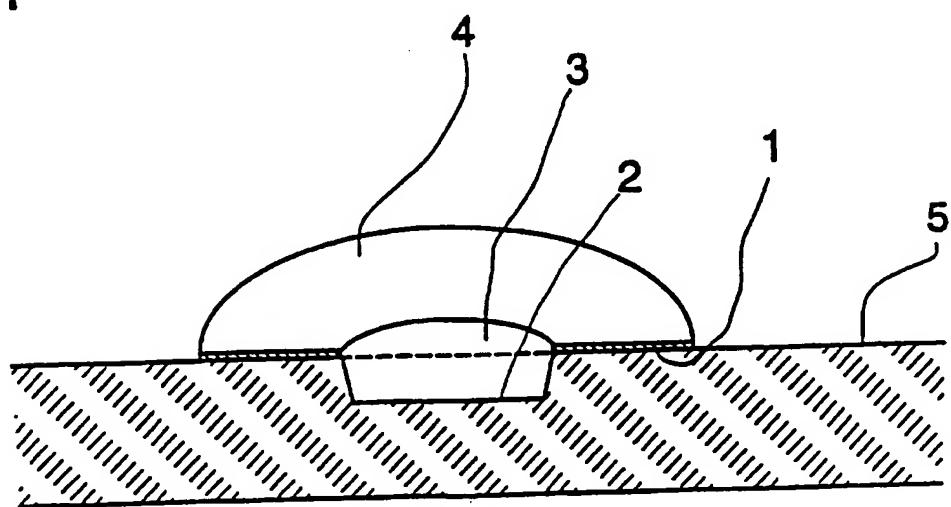


FIG.4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 97/03571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 B01J19/00 B01L3/00 C07K1/04 C07H21/00 C03C17/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 27719 A (BRENNAN THOMAS M) 8 December 1994	1,2,4-8, 12
Y	see page 3, line 7 - page 4, line 9	3
A	see page 4, line 15 - line 34	10
X	see page 7, line 2 - line 17	8
	see page 10, line 25 - line 35; figure 3 ---	
Y	US 4 728 792 A (WARNER GERALD T ET AL) 1 March 1988 see column 1, line 64 - column 2, line 11; claim 14; figure 2 ---	3
A	US 5 041 266 A (FOX WILLIAM A) 20 August 1991 see column 4, line 26 - line 34 see column 6, line 16 - line 58; figure 7 ---	9
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 October 1997

24/10/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hocquet, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No
PCT/EP 97/03571

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 35505 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 28 December 1995	1
A	see page 7, line 30 - line 32	8
A	see page 18, line 29 - line 34	10
A	see page 27, line 1 - line 4	10
A	---	
A	DE 39 15 920 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 22 November 1990	11
	see column 3, line 13 - line 22; claims 1,3,5	
	see column 3, line 67 - column 4, line 35	
	see column 8, line 19 - line 21; claim 15	
A	---	
X	MATSUDA T ET AL: "MICROFABRICATED SURFACE DESIGNS FOR CELL CULTURE AND DIAGNOSIS" ASAIO JOURNAL, vol. 40, no. 3, 1 July 1994, pages 594-597, XP000498248	1,12
	see the whole document	
X	EP 0 402 718 A (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND) 19 December 1990	1,2,4-8, 12
X	see page 2, line 28 - line 50	6,7
X	see page 3, line 4 - line 11	4
X	see page 3, line 12 - line 18; claim 2	8
X	see page 3, line 55 - page 4, line 2; claim 4	7
X	see page 7, line 47 - line 49	6,7
X	see page 8, line 9 - line 13; claim 5	6
X	see page 8, line 53 - line 57	1,12
X	see page 9, line 14 - line 21	1
X	---	
P,X	WO 97 22875 A (ECOLE POLYTECH ;BEATTIE PAUL DANIEL (CA); BREVET PIERRE FRANCOIS () 26 June 1997	1,9
	see page 9, line 2 - line 7	
	see page 9, line 24 - line 33	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l	Application No
	PCT/EP 97/03571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9427719 A	08-12-94	US 5474796 A AT 156034 T CA 2163781 A DE 69404657 D EP 0703825 A JP 9500568 T		12-12-95 15-08-97 08-12-94 04-09-97 03-04-96 21-01-97
US 4728792 A	01-03-88	SE 455821 B EP 0203048 A JP 1864610 C JP 61266980 A SE 8502474 A		08-08-88 26-11-86 08-08-94 26-11-86 21-11-86
US 5041266 A	20-08-91	US 5229163 A		20-07-93
WO 9535505 A	28-12-95	AU 2862995 A CA 2192095 A		15-01-96 28-12-95
DE 3915920 A	22-11-90	NONE		
EP 0402718 A	19-12-90	JP 2023897 C JP 3007576 A JP 7051061 B JP 3007577 A DE 69013764 D US 5593814 A US 5202227 A		26-02-96 14-01-91 05-06-95 14-01-91 08-12-94 14-01-97 13-04-93
WO 9722875 A	26-06-97	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/03571

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 B01J19/00 B01L3/00 C07K1/04 C07H21/00 C03C17/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 27719 A (BRENNAN THOMAS M) 8. Dezember 1994	1,2,4-8, 12
Y	siehe Seite 3, Zeile 7 - Seite 4, Zeile 9	3
A	siehe Seite 4, Zeile 15 - Zeile 34	10
X	siehe Seite 7, Zeile 2 - Zeile 17	8
	siehe Seite 10, Zeile 25 - Zeile 35; Abbildung 3	

Y	US 4 728 792 A (WARNER GERALD T ET AL) 1. März 1988	3
	siehe Spalte 1, Zeile 64 - Spalte 2, Zeile 11: Anspruch 14; Abbildung 2	

A	US 5 041 266 A (FOX WILLIAM A) 20. August 1991	9
	siehe Spalte 4, Zeile 26 - Zeile 34	
	siehe Spalte 6, Zeile 16 - Zeile 58; Abbildung 7	

	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

• Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

• "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

• "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

• "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

• "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

• "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

• "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

• "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

• "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

• "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17. Oktober 1997

24/10/1997

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hocquet, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/03571

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 35505 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 28.Dezember 1995	1
A	siehe Seite 7, Zeile 30 - Zeile 32	8
A	siehe Seite 18, Zeile 29 - Zeile 34	10
A	siehe Seite 27, Zeile 1 - Zeile 4	10
A	---	
A	DE 39 15 920 A (MESSERSCHMITT BOELKOW BLOHM) 22.November 1990	11
	siehe Spalte 3, Zeile 13 - Zeile 22;	
	Ansprüche 1,3,5	
	siehe Spalte 3, Zeile 67 - Spalte 4, Zeile 35	
	siehe Spalte 8, Zeile 19 - Zeile 21;	
	Anspruch 15	
A	---	
X	MATSUDA T ET AL: "MICROFABRICATED SURFACE DESIGNS FOR CELL CULTURE AND DIAGNOSIS" ASAIO JOURNAL, Bd. 40, Nr. 3, 1.Juli 1994, Seiten 594-597, XP000498248	1.12
	siehe das ganze Dokument	
X	EP 0 402 718 A (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND) 19.Dezember 1990	1,2,4-8, 12
X	siehe Seite 2, Zeile 28 - Zeile 50	6,7
X	siehe Seite 3, Zeile 4 - Zeile 11	4
X	siehe Seite 3, Zeile 12 - Zeile 18;	8
	Anspruch 2	
X	siehe Seite 3, Zeile 55 - Seite 4, Zeile 2; Anspruch 4	7
X	siehe Seite 7, Zeile 47 - Zeile 49	6,7
X	siehe Seite 8, Zeile 9 - Zeile 13;	6
	Anspruch 5	
X	siehe Seite 8, Zeile 53 - Zeile 57	1.12
X	siehe Seite 9, Zeile 14 - Zeile 21	1
X	---	
P,X	WO 97 22875 A (ECOLE POLYTECH ;BEATTIE PAUL DANIEL (CA); BREVET PIERRE FRANCOIS () 26.Juni 1997	1,9
	siehe Seite 9, Zeile 2 - Zeile 7	
	siehe Seite 9, Zeile 24 - Zeile 33	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/03571

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9427719 A	08-12-94	US 5474796 A AT 156034 T CA 2163781 A DE 69404657 D EP 0703825 A JP 9500568 T	12-12-95 15-08-97 08-12-94 04-09-97 03-04-96 21-01-97
US 4728792 A	01-03-88	SE 455821 B EP 0203048 A JP 1864610 C JP 61266980 A SE 8502474 A	08-08-88 26-11-86 08-08-94 26-11-86 21-11-86
US 5041266 A	20-08-91	US 5229163 A	20-07-93
WO 9535505 A	28-12-95	AU 2862995 A CA 2192095 A	15-01-96 28-12-95
DE 3915920 A	22-11-90	KEINE	
EP 0402718 A	19-12-90	JP 2023897 C JP 3007576 A JP 7051061 B JP 3007577 A DE 69013764 D US 5593814 A US 5202227 A	26-02-96 14-01-91 05-06-95 14-01-91 08-12-94 14-01-97 13-04-93
WO 9722875 A	26-06-97	KEINE	